

EL COMPLEXE DE GOLGI I ELS GRANULS CORTICALS EN ELS OOCITS D'Acanthochitona fascicularis, L. (1767) (MOLLUSCA, POLIPLACOFORA)

M. DURFORT i J. GARCIA VALERO

Unitat de Biologia Cel·lular. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona
Avgda. Diagonal 645., 08028 BARCELONA

Els grànuls corticals dels oòcits són particularment sensibles a les variacions de pH i la reacció cortical que culmina en llur exocitosi és en part motivada per un canvi de pH intracel·lular. Afegint clorur sòdic al aigua de mar LOEB (1891) va obtenir una solució hipertònica que provocà la primera partenogènesi experimental dels oòcits d'eriçons de mar i va aconseguir larves pluteus.

DALQ (1924) jugant amb la proporció dels ions minerals de l'aigua de mar va provocar el desenvolupament larvari d'oòcits no fecundats d'Asterias.

El bioquímic danès SORENSEN (1868-1939), introductor del símbol pH (1909), va dissenyar diverses solucions tamponadores que s'han fet servir tan pels estudis estructurals com pels treballs ultraestructurals.

El tampó SORENSEN a base de fosfat monosòdic i de fosfat bisòdic va ésser introduït en la fixació de les mostres destinades a ésser estudiades al microscopi electrònic per KAYE (1958) i per MILLONING (1961) en combinació amb el tetròxid d'osmi; per SEDOR (1962) junt amb el permanganat potàssic i per SABATINI, BENSCH i BARNETT (1963) tamponant el glutaraldehyd, éssent aquesta una de les solucions fixadores més emprades fins l'actualitat.

Amb aquesta nota que versa sobre els grànuls corticals dels oòcits d'un mol·lusc polioplacófor, volem retre homenatge a SORENSEN en el cinquantanari de la seva mort, per la contribució que ha representat la seva solució tamponadora en els estudis ultraestructurals.

A B S T R A C T

THE GOLGI COMPLEX AND THE CORTICAL GRANULES OF THE Acanthochitona fascicularis OOCYTES.

In the oocytes of Acanthochitona fascicularis, cortical granules are formed in the peripheral ooplasm during late stages of oogenesis. The Golgi complex is also involved in the process. Inclusions characteristics of the interior ooplasm are present in the cortex interspersed among the cortical granules, for exemple: yolk platelets, lipid droplets, annulate lamellae and the nucleolar bodies.

This cortical granules in this specie showing the aspect of the cortical granule discharge of the others species, but applying various citochemical technical, at both the light and electron microscope levels, a glycoprotein components has benn demonstrated in the cortical granules of the A.fascicularis.

Key words: cortical granules, Golgi complex, oocytes, Polyplacophora, ultrastructure.

Introducció

L'òocit és una cèl.lula altament sintetitzadora. A lo llarg del procés de l'oogènesi, alhora que hi han els canvis a nivell nuclear, el ooplasma és séu d'una biogènesi de membranes i d'estructures vesiculars que tenen, a grans trets, dues finalitats: la síntesi i magatzament de les plaquetes vitel.lines així com la dels grànuls corticals. Els dos tipus d'estructures marquen dons el caràcter sintetitzador de la cèl.lula germinal femenina.

Mentres el vitel romàn en l'ooplasma i jugarà un paper fonamental en la determinació del tipus de segmentació dels ous fecundats alhora que no són, en molts casos, aliens a la transmissió de determinats factors hereditaris, els grànuls corticals que es disposaran preferentment en la periferie del ectoplasma oocitari seran rapidament excitats a l'espai perioocitari una vegada assolida la fecundació i així evitar la polispermia. la penetració del acrosoma, canvis bruscs de pH o de temperatura poden en molts casos desencadenar la reacció cortical.

Si bé en la majoria dels casos estudiats la reacció acrosòmica s'esdevé després de la fecundació, LARKMAN i CARTER (1984) en una espècie d'anémone de mar, Actinia fragacea, descriuen un cas d'exocitosi lenta dels grànuls corticals previa a la fecundació dels oòcits, la qual es fa en una àrea predeterminada, molt concreta, "marcada" per la presència d'unes estructures sensorials molt especials. En aquesta espècie els ous fecundats continuen embolcallts per una capa cortical formada pels grànuls corticals que es mantenen individualitzats i persisteixen durant tota la fase larvària ubicats en la capa ectodérmica de la larva plànula i llur funció roman desconeguda.

La presència de grànuls corticals no fusionats a nivell de fases larvaries ja havia estat descrita per HUMPHREYS (1967) en les gastrulles de Mytilus edulis.

¿En quin moment es formen els grànuls corticals?, ¿quines estructures citoplasmàtiques hi estàn implicades en la seva gènesi?, ¿quina és llur composició química?, ¿en quin moment precis té lloc la reacció cortical, és a dir llur exocitosi?. No hi ha llògicament una resposta única, dependrà de l'espècie i de la seva biologia de la reproducció, encara que hi han unes generalitats que es troben quasi bé en totes les espècies estudiades de l'escala filogenètica.

Des de la primera descripció dels grànuls corticals per HARVEY (1911) en oòcits d'Arbacia i llur primer estudi ultraestructural per AFZELIUS (1956) fins l'actualitat han estat descrits en nombroses espècies d'in-

vertebrats i també de vertebrats. Revisions generals sobre la gènesi, la ultraestructura, naturalesa química i funció dels grànuls corticals son els treballs de SCHUEL (1978) i el de GURAYA (1982), cal també recordar la revisió de GULYAS (1980) concretament sobre els grànuls corticals dels oòcits de mamífers.

La gènesi dels grànuls corticals dels oòcits d'Acanthochitona fascicularis a partir del complex de Golgi i una aproximació de llur naturalesa química serà considerada en la present nota i d'alguna manera complementa els estudis duts a terme sobre diverses espècies de mol·luscs polioplacóforos que hem anat fent a lo llarg dels darrers anys.

Material i mètodes

S'han estudiat al microscopi electrònic de transmissió les gónades femenines d'Acanthochitona fascicularis a lo llarg de l'any. Els mesos mostrejats han estat març, juny i setembre. Els exemplars procedien de Santander (Cantabria) i han estat els del mes de juny i setembre els que tenien les gónades madures.

Fragments de la gónada han estat habitualment doblement fixades, primer en glutaralhid-paraformalhid al 3,5%, tamponat a pH 7,2 - 7,3 mitjançant cacodilat sòdic o amb tampó Sørensen, durant dues hores a 4° C. Un bon rentat de 30 minuts amb la solució tampó ha precedit la postfixació amb tetròxid d'osmi al 2%, igualment tamponat, durant dues hores igualment a 4°C. Alguns fragments de gónada han estat solsament fixats amb el glutaralhid-paraformalhid per evitar l'enegrimient produït pel tetròxid d'osmi i així aplicar determinades reaccions citoquímiques (GARCIA VALERO i DURFORT, 1988).

Una acurada deshidratació amb una serie ascendent d'acetones ha estat prèvia al tractament amb l'oxid de propilè, agent intermediari habitualment emprat abans de fer l'inclusió en Spurr (1969).

Com és habitual, els talls semifins han estat tenyits amb el blau de metilè al 1% preparat amb bórax igualment al 1% i els talls ultrafins han estat contrastats rutinariament amb l'acetat d'uranil seguit del citrat de plom, preparat segons la tècnica de REYNOLDS (1963).

Tècniques citoquímiques

Totes s'han realitzat sobre talls recollits amb reixetes d'or, provinents de mostres no osmificades.

a) Tècnica de l'àcid fosfotúngstic (AFT)

Es procedí a una oxidació prèvia, mitjançant flotació dels talls sobre una solució d'àcid periòdic al 10%, seguit de l'acció de l'àcid fosfotúngstic a una concentració del 1% en ClH diluït fins aconseguir un pH de treball de 0,3.

Controls: Es van obtenir mitjançant un procés paral·lel d'oxidació seguit del tractament amb la solució de ClH, sense emprar l'àcid fosfotúngstic.

b) Tècnica del PATAg

Es va seguir la descrita per THIERY (1967), amb una oxidació prèvia mitjançant una solució d'àcid periòdic al 10%, perllongant-se l'acció de la tiosemicarbazida per espai de 48h.

Controls : Es van obtenir mitjançant un procés paral·lel, obviant l'acció de la tiosemicarbazida i substituint-la per una solució d'àcid periòdic al 1%.

c) Digestió amb pronasa

Inmediatament després de l'oxidació descrita, es realitzà una incubació amb pronasa E (Sigma: activitat de 4 U/ mgr) al 2% en PBS, al llarg de 60 minuts, a 37°C.

Controls: Es realitzaren mitjançant una incubació de les mateixes característiques anteriors, sense presència d'enzim però, a la solució tampó.

Les observacions han estat fetes amb un microscopi Phillips 200 i Hitachi del Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat de Barcelona.

Resultats i Discussió

En les etapes finals de la vitel·logènesi, la zona cortical dels oòcits madurs d'Acanthochitona fascicularis apareix rica en estructures vesiculo-membranoses. destaca en primer lloc la proliferació dels dictiosomes amb les cisternes, en nombre de tres a cinc, fortament dilatades i amb una matriu considerablement electrodensa. La disposició de les cisternes dificulta el reconeixement de les cares de maduració i formació del dictiosoma. Les vesícules acompanyants, de 0,5 a 3 micres de diàmetre es van fusionant i acaben formant grans vesícules de

contingut molt poc electrodens, de textura fibrosa, lleugerament granulada, difícil de posar de manifest fotogràficament en molts casos.

(Fig.1)



Fig.1.- Imatge ultraestructural de la zona cortical d'un oòcit d'*Acanthochitona fascicularis* en la darrera etapa de la vitel.lo-gènesi. Vegis el desenvolupament del complex de Golgi (d) i la proximitat topogràfica assolida entre els dictiosomes (d) i els grànuls cortical (gc). (v): microvillis emesos per l'olemma. Contrastat rutinari: acetat d'uranil - citrat de plom. (18.000 x).

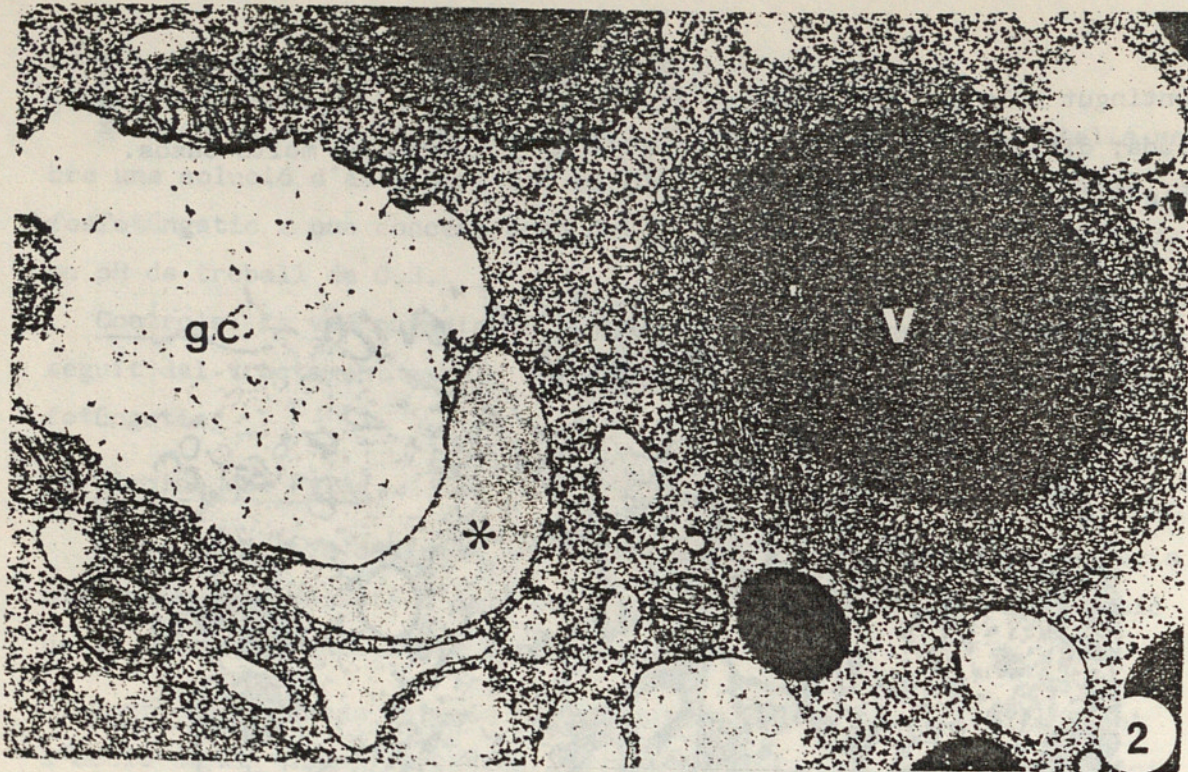


Fig.2.- Imatge ultraestructural dels elements més representatius de la zona cortical dels oòcits madurs d'*Acanthochitona fascicularis*. (gc): grànul cortical., (v): vitel., (*) inclusió lipídica. Contrastat: acetat d'urànil-citrat de plom. (22.000 x).

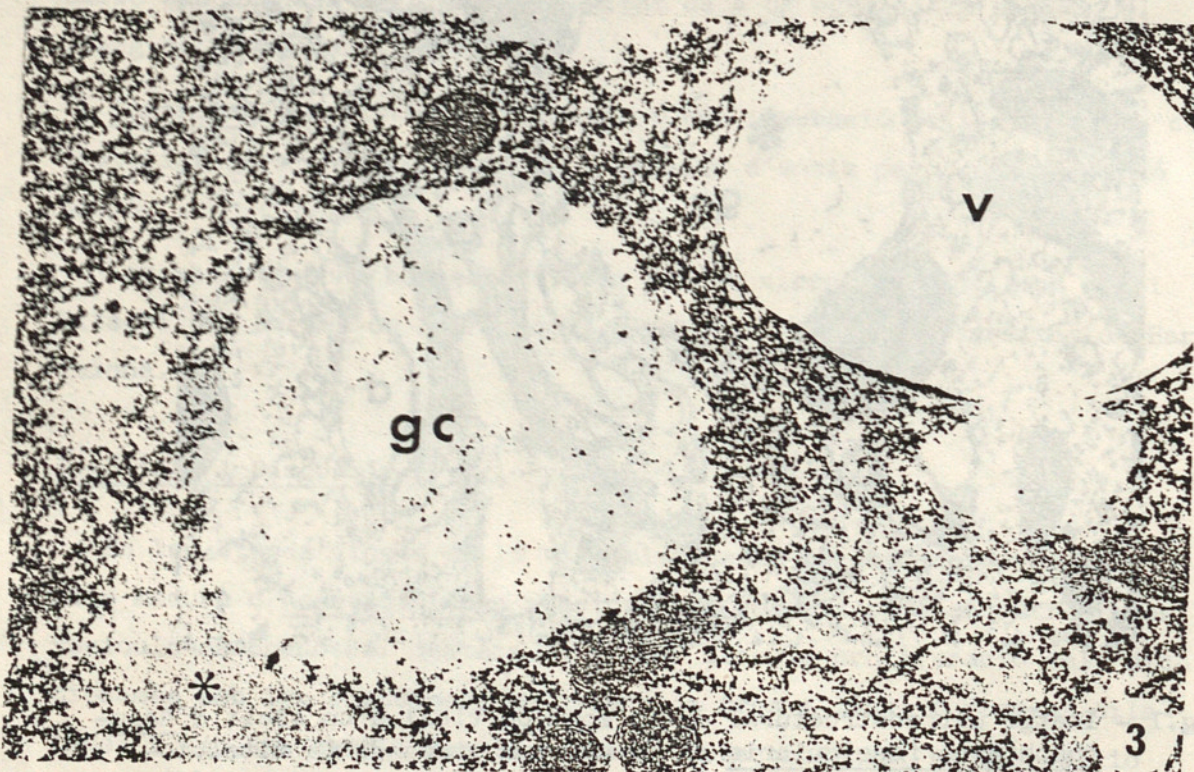


Fig.3.- Un tractament previ amb pronasa al 1% i un doble contrastat amb l'acetat d'urànil i el citrat de plom dona aquesta imatge en la que destaca la total digestió de la plaqueta vitel.lina (v). El grànul cortical presenta el mateix tipus de amriu que en els controls. (22.000 x).

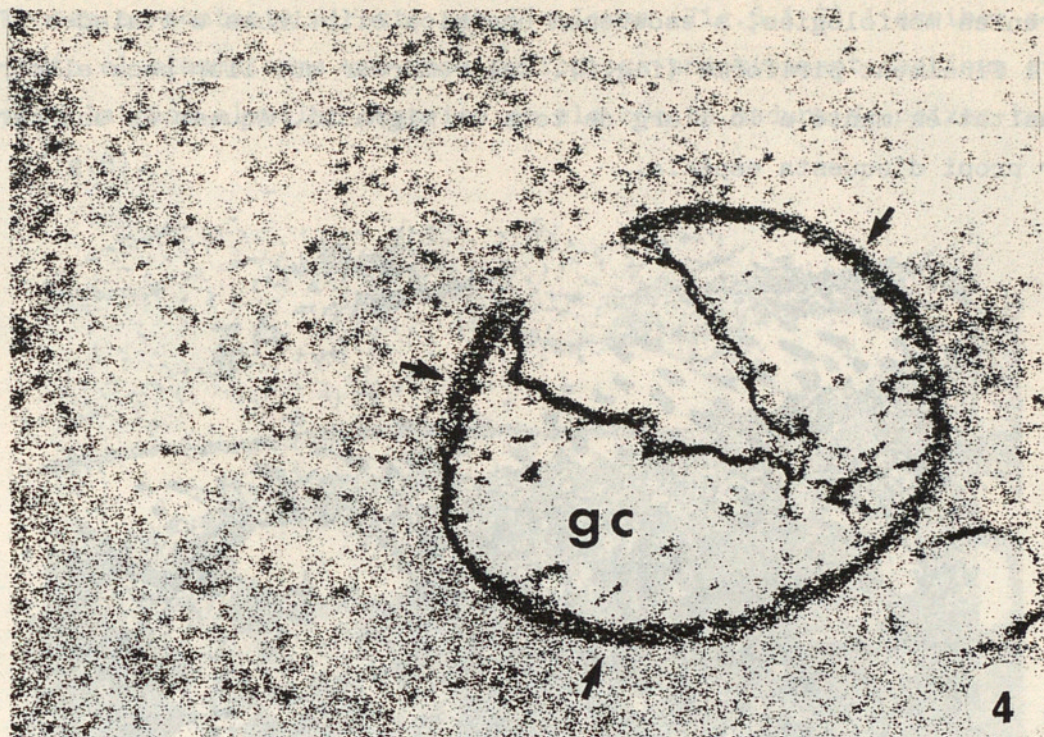


Fig.4.- El tractament amb l'àcid fosfotungstic dona aquesta particular distribució dels components de la matriu del grànul cortical. Vegis l'elevat contrast de la periferie del grànul.(20.000 x).

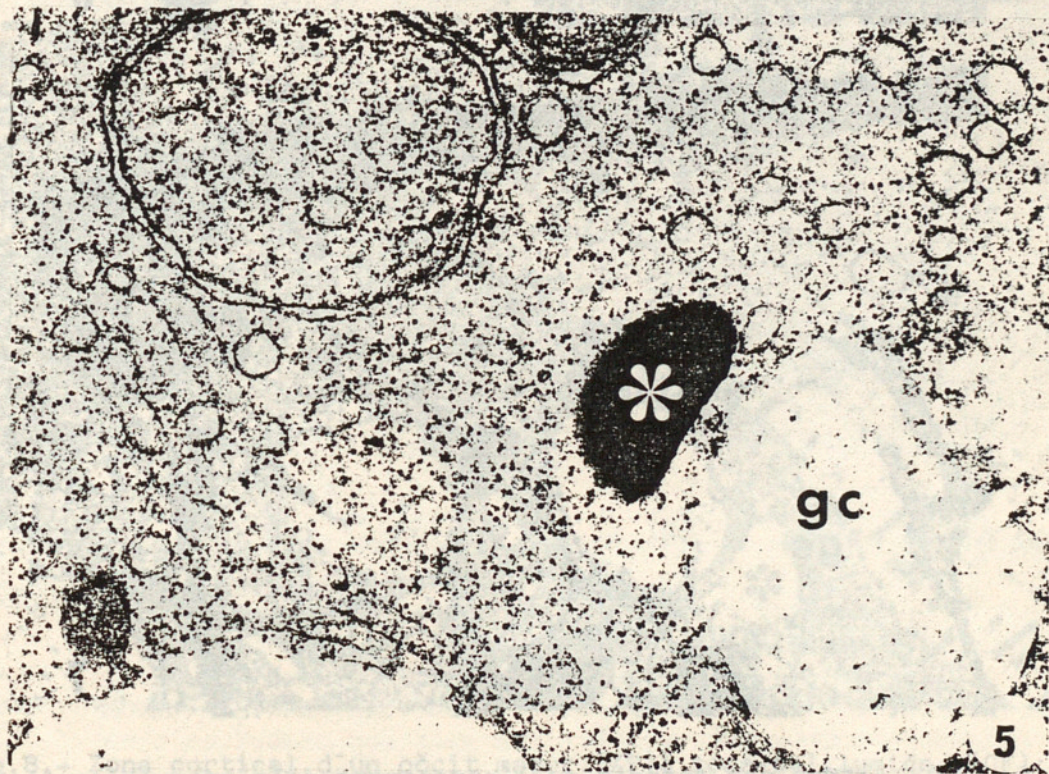


Fig.5.- Tractament amb la técnica de THIERY. vegis com l'inclusió apertment lipídica (*) de la fotografia nº 2 ha quedat extraordinàriament contrastada, aixó fa pensar en la presència de sucres a més a més de la fracció lipídica correspondent. (gc): grànul cortical. el glicògen queda igualment patent que en el contrastat rutinari (Fig.2 i 3).(20.000x).

Els grànuls corticals a mesura que s'apropen al oolemma adopten diferents morfologies, s'esdevenen una mica elíptiques u ovalades (Fig. 6) i finalment piriforme (fig.7). Cal remarcar que llur poca electrodensitat es manté a lo llarg de tota la migració. Aquest és una caràcter propi d'aquesta espècie.

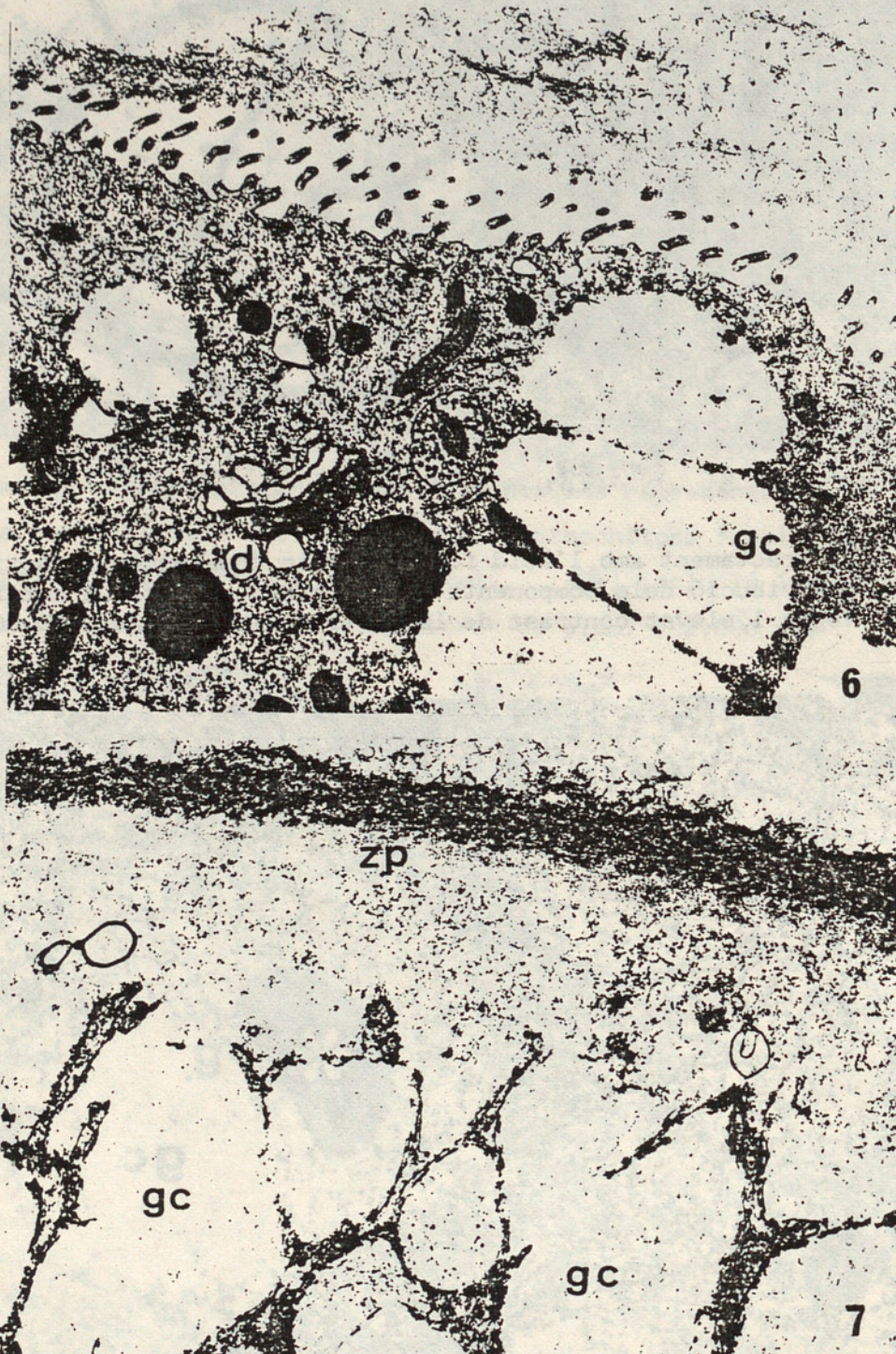


Fig.6: i 7.- Altres dos estadis de l'apropament dels grànuls corticals vers l'oolemma. En l'imatge 5 podem veure encara un dictiosoma (d) i com els grànuls s'han aplanat lleugerament (28.000x). Malgrat no haver-hi hagut fecundació hi ha una exocitosis, al menys aparent, en la fig.7. (zp): zona pel.lucida. Contrastat rutinari (28.000x).

En les darreres etapes del procés de maduració els grànuls corticals es troben en contacte directe amb l'olemma (Fig.6 i 7) i arriben a formar sota el plasmalemma una capa vesiculosa practicament continua que recorda la capa alveolar descrita en els oòcits madurs de peixos teleostis (Fig.8).

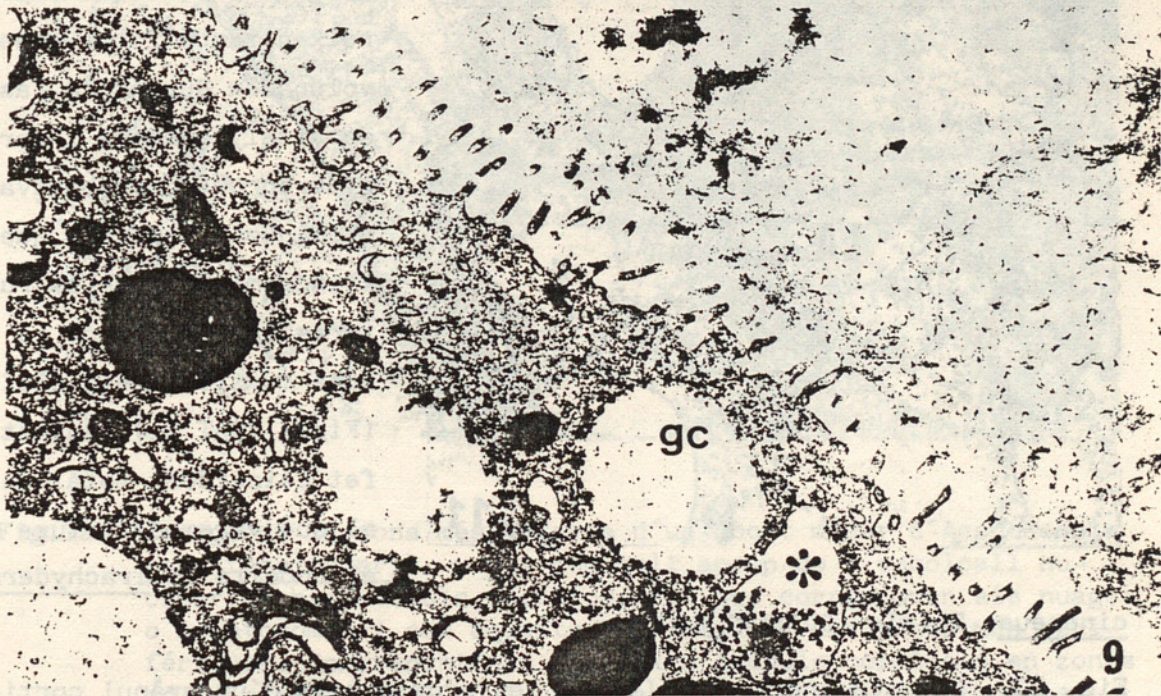
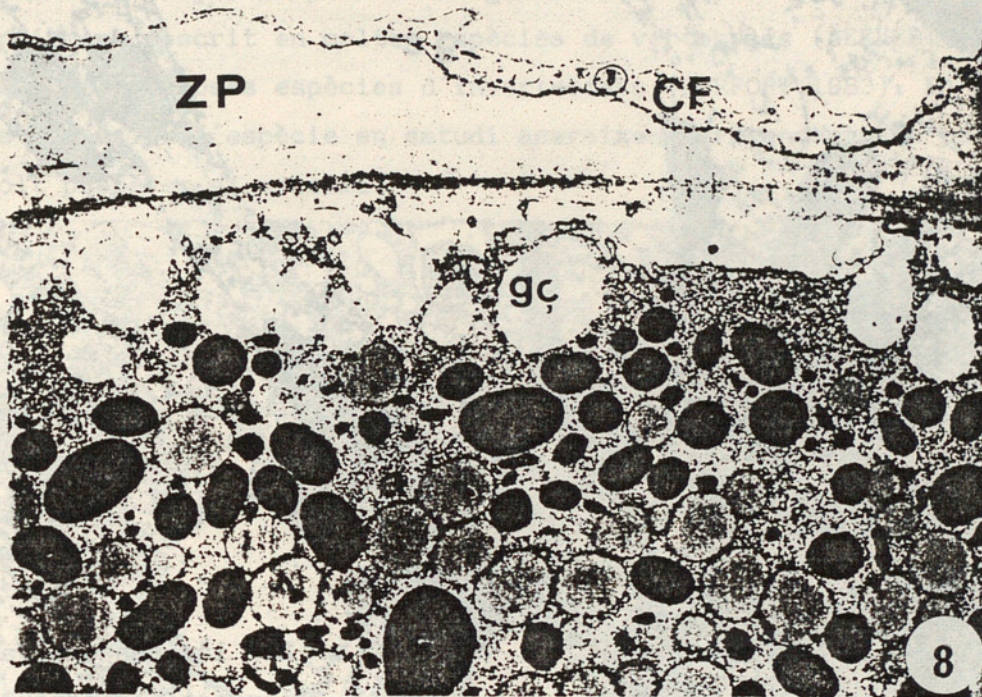
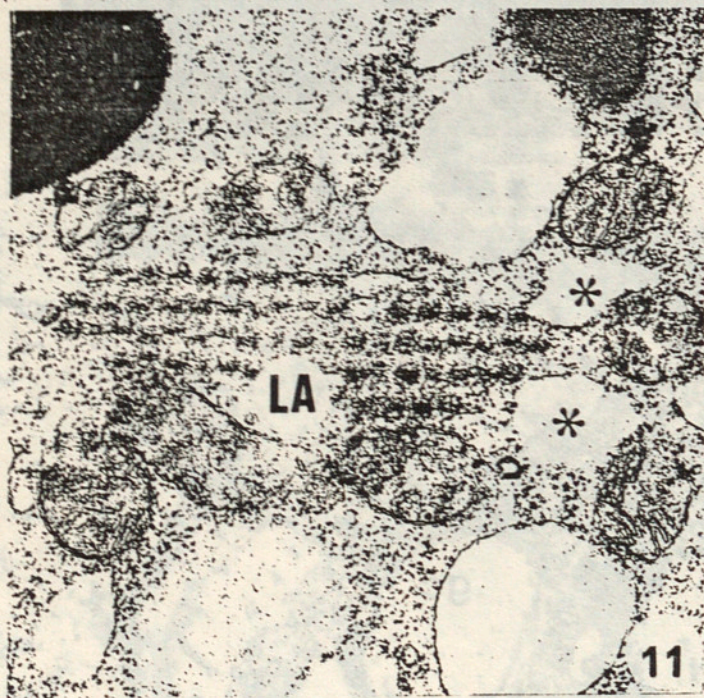
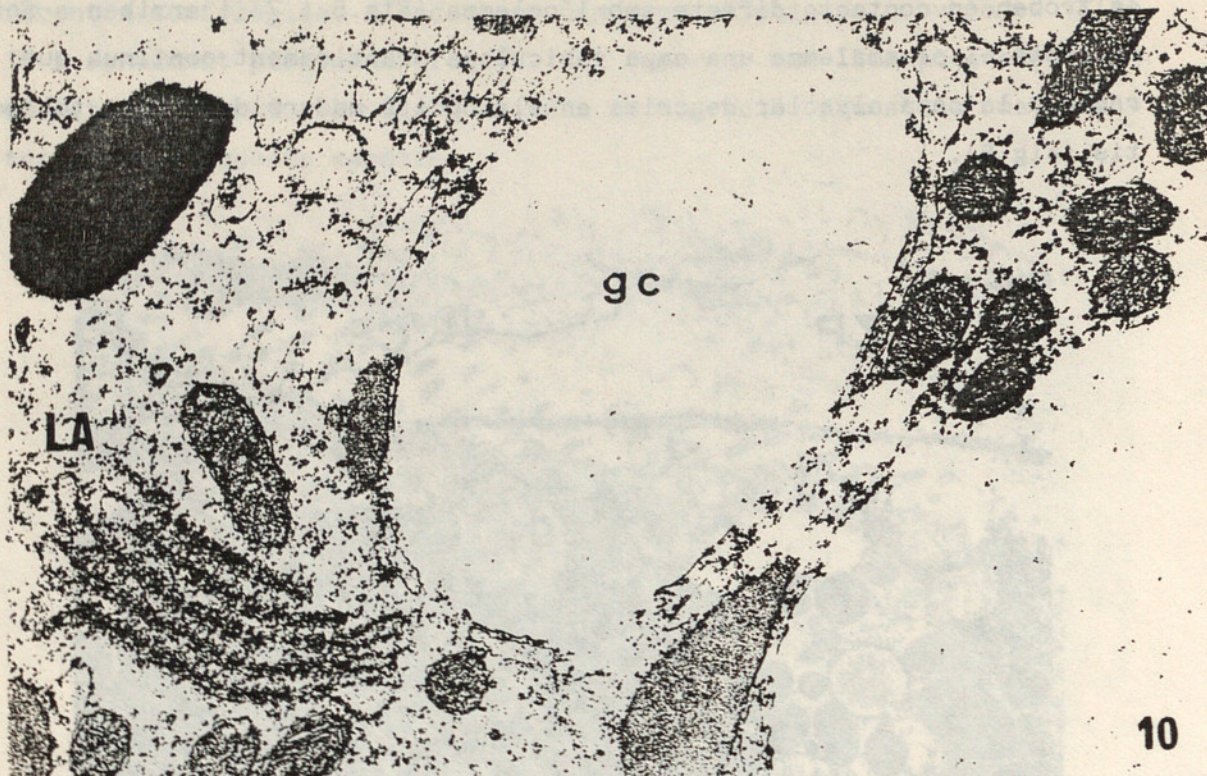


Fig.8.- Zona cortical d'un oòcit madur.(ZP): zona pel.lucida.,(CF): cèl.lula fol.licular., (gc): grànul cortical;(v): vitel.,(L): lípids. (6.800 x).

Fig.9.- Presència d'un cos multivesicular (*) en les proximitats del oolemma, veigis l'emissió de microvillis (mv). (d);dictiosoma (gc): grànul cortical; (v): vitel. (20.000 x).



Les lâmines anellades o lâmines periòdiques apareixen també força desenvolupades durant la fase de vitel·logènesi i enregistren una progressiva disminució a mesura que s'incrementen les estructures vesiculars de la zona cortical dels oòcits (Figs: 10 i 11). Aquest fet coincideix totalment al que vàrem descriure en els oòcits de Trachydermon

cinereus, Thiele (DURFORT, 1976).

Fig. 10.- Lâmines anellades (LA) en les proximitats d'un grànul cortical (gc). (23.000 x).

Fig. 11.- Detall de la proximitat topogràfica entre un conjunt de lâmines anellades i els grànuls corticals incipients (*). Vegis els mitocondris proxims a elles. (23.000 x).

Coincidint amb aquest gran desenvolupament de les estructures vesiculo-membranoses en l'ectoplasma dels oòcits de A. fascicularis, trobem en les proximitats del embolcall nuclear un considerable nombre de emissions nucleolars o nuages que anirà emigran cap a zones més perifèriques. Aquestes formacions són, com és habitual, molt més nombroses en les etapes de previtel.logènesi i de vitel.logènesi, fet ja ampliament descrit en moltes espècies de vertebrats (AZEVEDO,1984) així com en nombroses espècies d'invertebrats (DURFORT,1983). En els oòcits madurs de l'espècie en estudi apareixen sorprendentment en zones molt properes al oolemma.

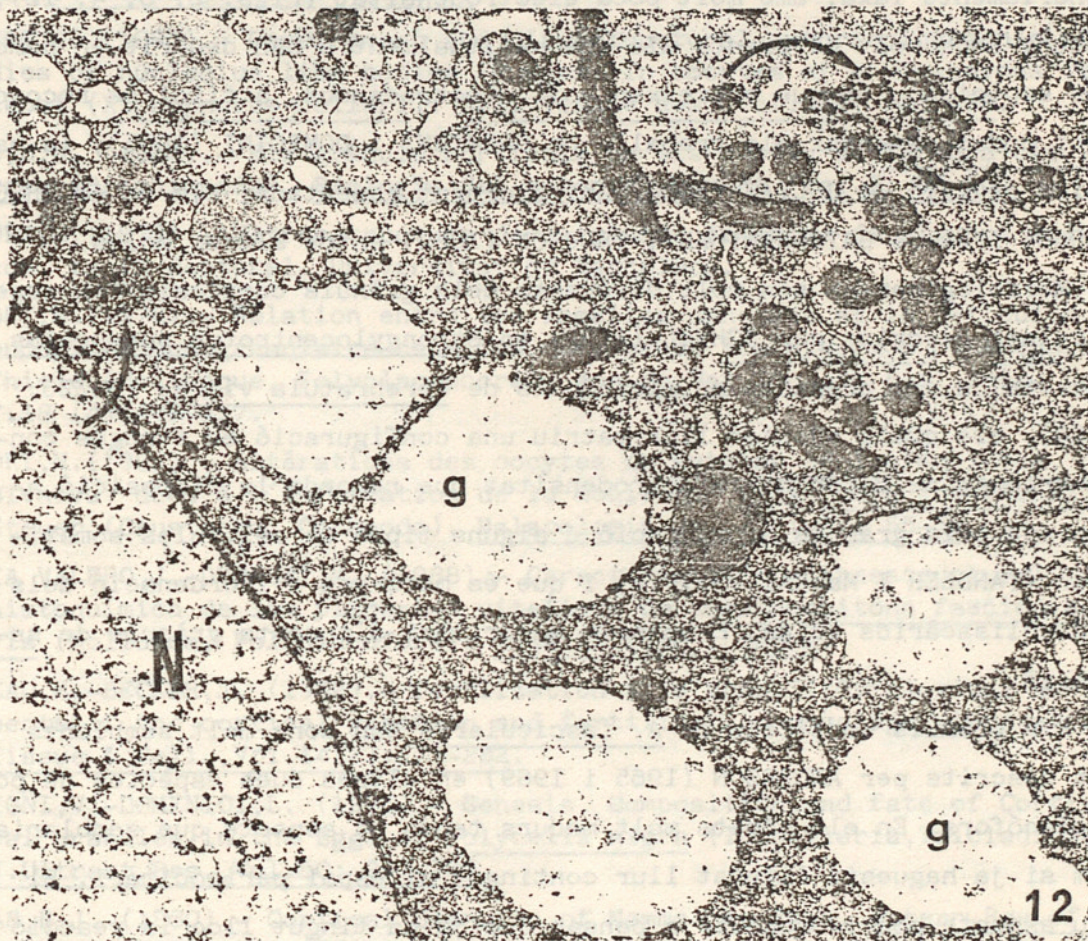


Fig.12.- Imatge de la zona més interna d'un oòcit madur d'Acanthochitona fascicularis. vegis com molt aprop de l'embolcall nuclear hi han acúmuls electrodensos que corresponen als nuages o nematosomes i com aquests van emigran vers zones més perifèriques. Sorprenentment apareixen grànuls corticals en zones molt internes (gc). Cal observar l'abundància de ribosomes en l'ooplasmma que dona aquesta particular electrodensitat a l'oòcit. Contrastat rutinari: acetat d'uranil i citrat de plom. (20.000 x).

Al igual dons que s'esdevé en la major part dels oòcits de mol·luscs polioplacófors (ANDERSON, 1965 i 1969), els grànuls corticals de l'espècie en estudi s'originen a partir del complexe de Golgi, el qual està format per nombrosos dictiosomes de cisternes força dilatades i que no solsament es troben en zones properes al nucli sino també en la zona cortical (Fig.1). Els dictiosomes de A. fascicularis no tenen l'aspecte habitual, recorden més aviat el que adopten en els oòcits de Mytilus quan els exemplars están parasitats per Mytilicola intestinalis (DURFORT, 1982).

Els grànuls corticals d'aquesta espècie tenen una textura extraordinàriament laxa, amb molt poca electrodensitat (Figs: 2, 3, 4, 12), éssent dons molt diferents als que habitualment s'han descrit en nombroses espècies, en que apareixen molt electrodensos, a títol de recordatori podem esmentar els treballs de GREMIGNI i DOMECCINI (1975), la mateixa revisió de GULYAS (1980) anteriorment esmentada, els de ANDERSON (1968) i el de SATHANANTHAN i TROUSON (1982) entre altres molts.

Morfologicament són molt diferents dels grànuls corticals tan espectaculars descrits per SCHUEL (1982) en Strongylocentrotus purpuratus (garota) o els presents en els oòcits de Terebratula vitrea (BOZZO, 1984), els quals adopten llur matriu una configuració en franges concèntriques de diferenta electrodensitat que recorda la disposició adoptada pels grànuls de secreció d'alguns tipus de cél·lules somàtiques (TANDLER i MacCALLUM, 1972) i que és motivada a l'ordenació dels mucopolisacàrids àcids, component majoritari d'aquests grànuls de secreció.

Els grànuls corticals de A. fascicularis son dons molt semblants als descrits per ANDERSON (1965 i 1969) en altres dues espècies de polioplacófors. En els oòcits molt madurs tenen un aspecte que semblaria com si ja haguesin lliurat llur contingut al espai perioocitari. El seu aspecte podria conduir a pensar que ja ha tingut lloc la reacció cortical però el fet de que els grànuls corticals que es troben en zones més internes (Fig.12) ja tenen aquest aspecte i el fet de que els oòcits estudiats són intragonadals fa descartar totalment aquesta possibilitat.

També descartem llur possible caràcter artefactual degut a un pH incorrecte ja que aquest ha estat sempre molt controlat alhora que les imatges obtingudes han coincidit després d'haver aplicat diferents protocols.

BIBLIOGRAFIA

- AFZELIUS, B.A. (1956).- The ultrastructure of the cortical granules and their products in the sea urchin egg as studied with the electron microscope. Exp. Cell Res. Vol.10:257-285
- ANDERSON, E. (1965).- Events associated with differentiating oocytes in two species of Amphineurans (Mollusca) Mopalia muscosa and Chaetopleura apiculata. J. Cell Biol., Vol.27: 5-6A.
- ANDERSON, E. (1968).- Oocyte differentiation in the sea urchin Arbacia punctulata, with particular reference to the origin of cortical granules and their participation in the cortical reaction. J. Cell Biol., Vol.37 514-539.
- ANDERSON, E. (1969).- Oocyte-follicle cell differentiation in two species of Amphineurans (Mollusca) Mopalia muscosa and Chaetopleura apiculata. J. Morph., Vol.129: 89-126.
- AZEVEDO, C. (1984).- Development and ultrastructural autoradiographic studies of nucleolus like bodies (nuages) in oocytes of a Viviparous Teleost (Xiphophorus helleri). Cell Tissue Res., Vol.238: 121-128.
- BOZZO, M.G. (1984).- Els grànuls corticals en els oòcits de Terebratula vitrea (Brachiopoda). Biologia del desenvolupament. Vol.2: 95-100
- DURFORT, M. (1973).- Ultraestructura de la gónada femenina de alguns moluscos. tesis doctoral. Universitat de Barcelona.
- DURFORT, M. (1976).- Relation entre les lamelles annelées et le réticulum endoplasmique granulaire dans les oocytes de Trachydermon cinereus, Thiele (Mollusque, Polyplacophore). Ann. Sc. Nat. Zool. et Biol. Anim. T.18 (4):449-457.
- DURFORT, M. (1982).- Altérations des oocytes de Mytilus edulis (Mollusca, Bivalva) dues à l'infestation de la moule par Mytilicola intestinalis Steuer (Crustacea, Copepoda). Malacologia Vol.22(1-2): 55-59
- GARCIA VALERO, J.-DURFORT, M. (1988).- Caracterización ultraestructural e histoquímica de las plaquetas vitelinas de Acanthochitona fascicularis (Mollusca, Poliplacofora). IBER EM L.19., Lisboa.
- GOUDEAU, M.-BECKER, J. (1982).- fertilization in a crab. II: Cytological aspects of the cortical reaction and fertilization envelope elaboration. Tissue & Cell., Vol.14(2):273-282.
- GREMIGNI, V.-DOMENICI, L. (1975).- Genesis, Composition and fate of Cortical Granules in the Eggs of Polycelis nigra (Turbellaria, Tricladida) J. Ultrast. Res., Vol.50: 277-286.
- GULYAS, B.J. (1980).- Cortical Granules of Mammalian Eggs. Intern. Rev. of Cytol., Vol.63: 357-392.
- GURAYA, S.S. (1982).- Recent Progress in the Structure, Origin, Composition and Function of Cortical Granules in Animal Eggs. Intern. Rev. of Cytol., Vol.78: 257-361.
- HARVEY, E.N. (1911).- Studies on the permeability of cells. J. Exp. Zool. Vol.10: 507-556.
- HUMPHREYS, W.J. (1967).- The Fine structure of Cortical Granules in Eggs in Eggs and Gastrulae of Mytilus edulis. J. Ultrast. Res., Vol.17: 314-326.
- LARKMAN, A.U.-CARTER, M.A. (1984).- The apparent absence of a cortical reaction after fertilization in a sea anemone. Tissue & Cell Vol.16(1). 125-130.

LONGO, F.J.-ANDERSON, E. (1970).- A Cytological study of the relation of the cortical reaction to subsequent events of fertilization in urethane-treated eggs of the sea urchin, Arbacia punctulata. J. cell Biol., Vol.47: 646-665.

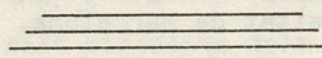
REYNOLDS, E.S. (1963).- The use of the lead citrate at high pH as an electron microscopy. J. Cell Biol., Vol.17:208-212.

SATHANANTHAN, A.H.-TROUNSON, A.O. (1982).- Ultrastructure of Cortical Granule Release and Zona Interaction in Monospermic and Polyspermic Human Ova Fertilized In vitro. Gamete Research. Vol.6: 225-234.

SPURR, A.R. (1969).- A low viscosity resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrast. Res. Vol.26: 31-43.

TANDLER, B.-MACCALLUM, D.K. (1972).- Ultrastructure and histochemistry of the submandibular gland of the European hedgehog, Erinaceus europaeus L. I.- Acinar secretory cells. J. Ultrast. Res., Vol.39: 186-204.

THIERY, J.P. (1967).- Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. J. Microsc. Vol.6:987-1018.



[Faint, illegible text from the reverse side of the page, appearing as bleed-through.]